

Pénicilline, notatine et autres mycoïnes

par *A. GIRARDET*

La surenchère des partis politiques, l'activité fiévreuse des journalistes en mal de copie à sensation, plutôt que de vérité scientifique, et bien d'autres causes encore, contribuent à créer dans le public une frénésie qu'il est bien difficile de satisfaire. Le merveilleux que recherchent déjà les enfants dans les contes de fées prend chez les adultes modernes une forme dont les conséquences ne sont que trop perceptibles aux psychiatres. Chacun se rappelle la vitesse vertigineuse avec laquelle le Cibazol est devenu un mot courant du vocabulaire de chacun. A peine cette comète avait-elle atteint son zénith, qu'elle pâlisait, pour ne plus être aujourd'hui, pour le laïque, qu'une étoile de troisième ou de quatrième grandeur. Le public se jeta avec d'autant plus d'avidité sur un astre infiniment plus brillant, qui apparaissait justement à l'horizon : la pénicilline. Que n'a-t-on déjà prédit de cet arcane des chimiothérapeutiques ? Combien de malades n'ont-ils pas déjà cru qu'elle allait les guérir ? Or, la nature de cette substance est maintenant connue, sa formule apparaît relativement simple, une synthèse est même prévisible à brève échéance et il faut bien se rendre compte qu'elle n'est pas la pierre philosophale qui rendra la santé à chacun. Elle a sauvé un membre ou même la vie à des dizaines de milliers de blessés sur les champs de bataille ; son emploi dans le traitement des ostéomyélites, de la pneumonie, de la méningite a sauvé bien des vies et elle en sauvera encore des centaines de milliers, aidant à prolonger la durée moyenne de la vie des habitants de notre planète... pour qu'ils aient le temps et l'occasion de mourir d'une autre mort, contre laquelle il n'y aura pas de super-pénicilline, cette fameuse bombe atomique, dont les philosophes du début de ce siècle entrevoyaient déjà les conséquences terribles, et à quoi les rares hommes encore conscients de leurs responsabilités ne peuvent songer sans frémir à l'idée de ce qui nous attend.

Il y a fort longtemps que les bactériologues avaient constaté que quand plusieurs colonies de bactéries ou de champignons se développaient sur une même plaque d'agar, il se trouvait parfois une moisissure, un actinomycète ou une bactérie qui gênait son voisin

dans son développement, ou l'inhibait complètement. Pasteur l'avait déjà signalé en 1877, puis Emmerich et Lœw, en 1899, en tirèrent parti, en préparant un extrait contenant les produits du métabolisme de *Bacterium pyocyaneum*. Cette « pyocyanase » devait permettre de lutter contre l'anthrax et la diphtérie ; elle ne réalisa pourtant pas les espoirs mis en elle, probablement à cause des actions secondaires des impuretés qu'elle contenait en grande quantité.

En 1929, une culture de *Staphylococcus aureus* du professeur A. Fleming, de l'Hôpital Ste-Marie, à Londres, fut envahie par un *Penicillum*. Celui-ci ayant provoqué dans son voisinage la mort du *Staphylococcus*, Fleming saisit l'importance clinique de sa découverte. Le professeur H. Raistrick, de la London High School of Hygiene and Tropical Medicine, étudia la biologie de ce champignon et en entreprit la culture en grand, ainsi que les premiers essais d'extraction du principe actif, nommé pénicilline. Par malheur, aucun clinicien n'en voulut faire des essais physiologiques ; comme les rendements étaient très faibles et les extraits très instables, Raistrick abandonna le problème.

Ce n'est qu'en 1939 que H. W. Florey, professeur de pathologie à Oxford, reprit la question. Malgré les difficultés provoquées par la guerre, son école put préparer suffisamment de produit pour que des essais cliniques puissent être exécutés ; les résultats furent tels que l'armée en commanda de grosses quantités. Les conditions de travail devenant trop difficiles, sous les bombes, les chercheurs se transportèrent aux Etats-Unis, où ils purent vaquer à leurs recherches dans des conditions idéales.

Le *Penicillum* en question fait partie d'un groupe de formes connues sous le nom de *P. chrysogenum* ; près de 200 races ont été étudiées par le seul Northern Regional Research Laboratory, à Peoria (U. S. A.). On a pu les classer selon la quantité de pénicilline à laquelle ils donnaient naissance dans des conditions de culture identiques, et on a trouvé tous les termes de passage entre celui qui n'en produisait point du tout (*P. chrysogenum*) et celui qui en produit le plus (*P. notatum*). Deux à trois d'entre elles furent retenues et d'autres laboratoires en ont certainement isolé d'autres encore. Des millions ont déjà été dépensés dans le seul but de trouver un microorganisme dont le rendement serait peut-être de 50 % supérieur à ceux déjà connus. Cette recherche comporte, outre l'étude de milliers d'organismes, celle des conditions et des types de mi-

lieux de culture. Elle est indispensable, vu les quantités nécessaires, le très faible rendement initial, le prix des installations, de même que la valeur humanitaire et commerciale du produit cherché.

Il fallut tout d'abord mettre au point un test capable de détecter rapidement la pénicilline, et de la doser même en faibles quantités. Florey choisit comme unité la quantité de pénicilline qui, dissoute dans 50 cc. de bouillon de viande, est juste suffisante pour inhiber le développement d'une souche particulière de *Staph. aureus* ; plus tard, il préféra le diamètre d'une zone d'inhibition, obtenue dans des conditions déterminées. Dans un mycélium de *Penicillium*, il découpe à l'aide d'un perce-bouchon de petites surfaces de 11 mm. de diamètre ; celles-ci sont introduites dans de petits cylindres de verre de même diamètre, qui ont été placés à la surface d'une plaque d'agarensemencée de *Staph. aureus* ou de *Bacterium Coli*. Après 16 heures, à l'étuve à 24°, on constate que le mycélium a sécrété une substance qui a diffusé dans l'agar et a empêché le *Staph. aureus* de se développer dans le voisinage du cylindre de verre. Le carré du diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel au logarithme de la concentration de la pénicilline. C'est ainsi qu'est née l'expression unité Oxford, qui vient d'être remplacée par une unité internationale, presque identique, soit 0,6 γ de pénicilline cristallisée.

D'autres tests sont parfois encore employés ; l'un d'entre eux permet de caractériser un centième d'unité Oxford par cc. en 2-4 heures.

Je n'entrerai pas dans les détails des milieux de culture ; les renseignements publiés n'indiquent peut-être pas les milieux trouvés les plus favorables ; la Raison d'Etat a tenu à éviter l'ébrulement de secrets aussi vitaux pour la conduite de la guerre ; il semble qu'il s'agisse d'un milieu Czapek-Dox légèrement modifié.

En 1941, les meilleurs milieux de culture ne contenaient guère davantage que 2 unités Oxford par cc. On admettait que ce faible rendement pourrait bien être un obstacle insurmontable ; c'est à ce moment précis qu'on s'aperçut qu'un extrait de malt, ajouté au milieu de culture, permettait de centupler le rendement ; celui-ci passait ainsi à près de 200 unités Oxford par cc., ce qui n'était pourtant que 0,12 mg, dont plus de la moitié se perdait au cours de la purification. Le produit a maintenant pu être cristallisé, et chaque milligramme correspond à 1650 unités internationales.

Le milieu de culture stérile, inoculé de *Penicillium*, est répandu en couche mince dans des récipients plats, et incubé quelques jours à 24°. Les besoins augmentant, des surfaces toujours plus considérables furent nécessaires. On entreprit donc des cultures en profondeur. Comme le champignon est aérobique, une forte injection d'air est nécessaire dans les tanks d'incubation, ce qui augmente les risques d'une infection secondaire. Or, une contamination, même vers la fin de la période d'incubation, par certains germes que l'on rencontre dans l'air, peut provoquer la destruction enzymatique en peu d'heures de toute la pénicilline produite. Les difficultés rencontrées au cours de ce mode de culture sont bien supérieures à celles de la fermentation acétone-alcool butylique, considérée déjà comme une des plus difficiles, mais chez laquelle une infection secondaire ne provoque en général qu'une faible baisse de rendement ; elles sont telles qu'on admet que seuls ceux qui ont 1 à 2 ans d'expérience peuvent être certains de réussir leurs cultures sans accroc. Pour ces cultures en profondeur, on utilise d'autres races que celles qui prospèrent le mieux en surface.

Une troisième méthode de culture industrielle est celle sur le son humide ; après 2-4 jours d'incubation, on trouve 200 à 400 unités par gramme de son desséché, que l'on pourra extraire par percolation. Comme les deux autres méthodes, celle-ci offre certaines difficultés dont je ne citerai que deux : le son est un mauvais conducteur de la chaleur ; il est donc difficile à stériliser avant l'emploi ; d'autre part, pour la même raison, et parce que la fermentation a tendance à faire monter la température bien au-dessus de l'optimum, le refroidissement de la masse présente de grosses difficultés.

De toute façon, la solution de percolation ou le bouillon de culture filtré devra rester stérile pendant l'extraction, ce qui n'est pas facile, vu qu'il serait encore un bon milieu de culture pour d'autres microorganismes.

Les quantités de pénicilline produites par l'industrie sont énormes ; alors qu'en mai 1943 on préparait 400 millions unités Oxford, (400 méga-unités), on arrivait en juillet à 760, en septembre à 1800 et en décembre à plus de 9000 méga-unités, et cette quantité était déjà plus que doublée en mars 1944 ; la progression semble avoir continué. Le prix, heureusement, s'est modifié en sens contraire. Alors que la méga-unité se vendait 800 francs en mai 1943, et que ce prix

ne couvrirait pas les frais de production, elle ne coûtait plus que 130 francs en mars 1944¹. A titre d'indication, il faut une méga-unité pour des cas de septicémie grave, et 7 à 10 fois moins pour une gonorrhée résistante aux sulfanilamidés.

Les renseignements publiés jusqu'à maintenant permettaient de croire qu'on se trouvait en présence d'un acide organique ; on l'extrayait par divers dissolvants organiques, puis on le transformait en sel de soude par du bicarbonate. La solution purifiée était congelée et desséchée dans le vide, comme le plasma sanguin. Par la chromatographie, on avait pu l'obtenir à l'état cristallin et on parlait même déjà de 3 pénicillines différentes ; elles ont reçu en Angleterre les numéros 1, 2 et 3, et en Amérique les lettres F, G et X ; la seconde domine le plus souvent.

Pendant que de nombreux chercheurs étudiaient ce *Penicillium notatum* Fleming et les produits de son métabolisme, d'autres isolaient dans le bouillon de culture de *Penicillium notatum* Westling une substance antibiotique qui a reçu le nom de notatine. Sa purification fut très rapidement achevée : la solution aqueuse est précipitée par l'acétone, ou comme tannate, dont l'acide tannique est extrait par l'acétone, ou enfin comme reineckate, dont le sel de Reinecke est aussi extrait à l'acétone. Cette notatine est un *ferment*, une *flavoprotéine*, capable de catalyser l'oxydation in vivo du glucose en acide gluconique, en présence d'oxygène, le tout s'accompagnant de la formation d'eau oxygénée. Cette substance avait déjà été décrite en 1928 par Muller, sous le nom de glucose-oxydase ; il l'avait obtenue d'une culture d'*Aspergillus niger*. Or, aux dernières nouvelles, cette notatine se trouve être identique à la pénicilline 2 (pénicilline G. des Américains)².

La production d'eau oxygénée est démontrée par l'inactivation de la pénicilline en présence de catalase, qui détruit l'eau oxygénée au fur et à mesure de sa formation, et par le fait que les bactéries qui succombent en présence de pénicilline sont tuées par des quantités d'eau oxygénée 5-10 fois inférieures à celles qui sont produites par ces *Penicillium*. Enfin, on a caractérisé dans les produits de dégrada-

¹ On atteignait 340,000 méga-unités en janvier 1945 (*Experientia* I 169).

² Selon Plattner, *Experientia* I 172, la notatine serait identique à la pénicilline B, tandis que les trois pénicillines F, G et X seraient bien des acides à faible poids moléculaire, contenant C, H, O, N et S. On les obtiendrait dans un milieu de Czapek-Dox additionné de certains extraits végétaux, alors que la notatine serait produite par le champignon dans ce même milieu, mais sans aucune adjonction.

tion, une alloxazine, par le test lumichrome, ainsi qu'un protéide de nature encore inconnue.

Nous connaissons déjà relativement bien une flavoprotéine, celle dont la lactoflavine, ou vitamine B₂ (ribose-diméthylalloxazine) fait partie du coferment, où elle est accompagnée d'acide phosphorique et d'adénine, alors que l'apoferment est un protéide. D'autre part, nous rencontrons encore cette vitamine B₂ dans le groupement prosthétique de différents autres ferments : l'amino-déhydrase, l'aldéhydo-déhydrase, la fumaro-déhydrase, la diaminoxidase (histaminase) et le ferment jaune de la respiration.

On s'est demandé si tout système fermentaire flavoprotéinique qui donnerait naissance à de l'eau oxygénée aurait la même action bactéricide ; cette supposition s'est trouvée confirmée par l'action bactéricide de la flavoprotéine du lait.

La nature fermentaire de cette grosse molécule nous permet de mieux comprendre les propriétés chimiques constatées au cours des essais d'extraction et d'administration au malade : la sensibilité relative à la chaleur, et considérable aux acides et aux alcalis, l'inactivation par les sels de métaux lourds, la destruction par le suc gastrique, de même que par une pénicillase (plus probablement simplement une hydrolase) sécrétée par B. Coli dans l'intestin (l'administration par voie rectale est presque sans effet), la grande solubilité et par conséquent la grande diffusibilité et la rapide élimination de l'organisme par voie urinaire, enfin l'action puissante à des doses extraordinairement faibles. Une dose considérable agit comme bactéricide, tandis qu'une dose juste suffisante pourra exercer une action bactériostatique ; les premiers auteurs, qui ne disposaient que de quantités insuffisantes ne connaissaient que cette seconde propriété ; mais on peut aller plus loin : si les doses administrées sont encore plus faibles, les bactéries auront le temps de s'habituer à l'eau oxygénée et deviendront pénicillino-résistantes. Une résistivité de ce genre a déjà été observée ; alors que l'on constatait la mort de Staph. aureus in vitro en présence d'une dilution de 1 sur 1 million de pénicilline, on est arrivé à rendre ces bactéries insensibles à des dilutions de moins de 1 sur mille ; il est vrai que la marge est bien plus faible que dans le cas des sulfamidés mais elle existe quand même et doit servir d'avertissement, pour éviter les erreurs dans l'application thérapeutique, qui conduiraient à la formation éventuelle de races de bactéries très résistantes à la

pénicilline. Heureusement que de nouveaux renseignements affirment qu'après quelques générations déjà, les races résistantes perdent ce pouvoir et redeviennent sensibles au médicament.

La production de pénicilline ou d'autres substances antibiotiques n'est pas réservée aux seules races de *Penicillium notatum* mentionnées plus haut ; toute une série d'autres *Penicillium* ont été étudiés ; de leurs milieux de culture, on a isolé des produits souvent encore bien impurs, qui ont reçu les noms de pénatine, claviformine, spinulosine, citrinine ; des *Aspergillus*, on a extrait l'aspergilline, la fumigatine, l'actinomycine, la parasiticine, tandis que l'*Aspergillus flavus* donnait de la flavicine, qui est probablement de la pénicilline ; différentes bactéries du sol ont donné la tyrocidine, la gramicidine, etc., tandis que les *Phycomyces* et les *Ascomyces* ne semblent rien donner de bien important. Tout récemment encore, l'examen des chapeaux de nombreux *Basidiomycètes* a permis de constater la présence de substances analogues ; ces derniers nous arrêteront encore un instant.

Sur 722 espèces de 96 genres de *Basidiomycètes*, étudiées en 1942-43 par l'Institut de mycologie d'Oxford, 70 d'entre elles donnent un extrait fortement bactériostatique, alors que 100 autres ne sont que faiblement positives envers *Staph. aureus* et, ou, *B. Coli*. Comme on ne pouvait songer à récolter des quantités suffisantes de ces champignons frais pour une production en grand, on a essayé des cultures artificielles de leurs spores, et on a constaté :

1. qu'un champignon dont l'extrait n'est pas actif sur le *Staph. aureus* et le *B. Coli* peut donner un milieu de culture actif contre *Staph. aureus* ou contre celui-ci et *B. Coli*, mais jamais contre *B. Coli* seulement ;

2. qu'un champignon dont l'extrait est actif sur l'une ou l'autre des bactéries sus-mentionnées donnera une culture mycélienne active contre les deux bactéries, ou contre le *Staph. aureus* seul, mais jamais contre le *B. Coli* seul ;

3. que si l'extrait du champignon est actif sur les deux bactéries, le produit de son métabolisme en culture artificielle l'est aussi.

L'avenir nous dira quelle est la parenté entre ces différentes substances, qui ont reçu le nom générique de mycoïnes.

Un avantage considérable de la pénicilline sur tous les autres médicaments, est son inocuité absolue ; des souris ont supporté sans sourciller des injections de 4 méga-unités par kilo et l'homme peut

être traité par plusieurs centaines de milliers d'unités chaque jour, sans en ressentir aucun effet désagréable ; ceci s'entend évidemment pour les solutions du produit cristallisé.

Je n'entrerais pas dans les détails concernant l'emploi médical de cette pénicilline ; l'injection intramusculaire ou intraveineuse est le meilleur moyen d'apporter rapidement aux tissus les doses nécessaires à la mise à mort des bactéries. D'autres méthodes seront applicables quand le prix du produit aura baissé (inhalation, application locale, etc.). L'important est de maintenir constamment une concentration suffisante dans le sang.

Ce ferment est infiniment plus actif que les meilleurs antiseptiques, ainsi que les sulfamidés ; administré en même temps que l'un ou l'autre de ces derniers, il semble donner lieu à une action synergique, qui n'est guère encore étudiée. L'emploi de cette pénicilline est tout particulièrement intéressant dans le cas de maladies provoquées par des germes pathogènes devenus sulfamido-résistants ; je citerai comme exemple le cas de la gonorrhée, qui était guérie, il y a une dizaine d'années, dans le 95 % des cas au moins par les sulfamidés, alors qu'actuellement le 30 % des cas à peine répondent positivement à ce traitement ; la pénicilline est capable de la détruire dans pratiquement le 100 % des cas.

Je disais plus haut que la pénicilline n'est pas une panacée ; en effet, elle est sans effet sur *Staphylococcus albus*, *Mycobact. tuberculosis*, *B. pyocyaneus*, *Coli*, *paratyphosus*, *pneumoniae* (Friedl), *Past. pestis*, *Brucella melitensis* et *abortus*. Par contre, son effet est pratiquement certain contre les *Staph aureus*, *citreus*, *pyogenes*, contre un très grand nombre de *Streptococcus*, dont *S. haemolyticus* et *S. pneumoniae* ; envers *Sarcina lutea*, *Microc. gonorrhoeae* et *meningitidis*, *B. anthracis*, *Clostr. tetani*, *septicum*, *botulinum*, etc. *Actinom. bovis*, *Corynebact. diptheriae*, etc., etc.

La substance étant connue à l'état cristallisé, il conviendra de déterminer sa nature chimique exacte. La synthèse pourrait bien n'être plus ensuite qu'une question de temps. On peut parfaitement imaginer la synthèse de substances constituées par une alloxazine quelconque, accouplée à du ribose ou à un autre sucre, à une ou plusieurs molécules d'acide phosphorique, à une purine ou à une pyrimidine, puis à un protéide quelconque ; ces substances complexes varieront probablement non pas dans leur activité bactéricide typique, mais dans leur stabilité, leur toxicité vis-à-vis du malade, leur

vitesse d'élimination du corps, que sais-je encore. Peut-être en trouvera-t-on même qui seront actives envers des micro-organismes contre lesquels nous sommes encore sans défense. En attendant, personne ne songe à supprimer les immenses bacs de fermentation dans lesquels cette humble moisissure, contre laquelle on avait toujours énergiquement lutté, quand ce ne serait que dans les pots de confiture, alors que des centaines de millions lui sont maintenant consacrés, fait la synthèse de ce complexe fascinant, qui accumule les atomes et les molécules dans le seul but de préparer de l'eau oxygénée.

Références

- Wilkins, Harris. *Annals of applied biology* 31 4 261.
Coghill. *Chem. and Engineering News*, News ed. 22 588 (1944).
Thomann. *Journal suisse de pharmacie* 1944 181.
Buchi. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 1945 117.
Wettstein. *Schweizerische Medizinische Wochenschau* 1944 617 ; 1945 613.
Raistrick et alia. *Biochemical Journal* 1945 24.

14 août 1945.
